

⑫ 公開特許公報(A) 平2-243633

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成2年(1990)9月27日

A 61 K 39/02
39/085
39/10
39/106
39/108
39/39

8829-4C
8829-4C
8829-4C
8829-4C
8829-4C
8829-4C

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全39頁)

⑭発明の名称 ワクチン製剤

⑯特 願 平1-6759

⑰出 願 平1(1989)1月13日

優先権主張 ⑱昭63(1988)4月8日⑲日本(JP)⑳特願 昭63-86693

㉑発明者 田村 愼一 神奈川県横須賀市森崎4-1-31
㉒発明者 倉田 毅 東京都府中市四谷1-6-1
㉓発明者 相澤 主税 神奈川県横須賀市湘南鷹取3-21-10
㉔発明者 長峰 隆 神奈川県横須賀市池田町5-90-73
㉕出願人 北里研究所(社団法人) 東京都港区白金5丁目9番1号
㉖代理人 弁理士 小林 和憲 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ワクチン製剤

2. 特許請求の範囲

(1) トキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤。

(2) トキシンが細菌トキシンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(3) 細菌トキシンがコレラトキシン、ブドウ球菌αトキシン、ブドウ球菌δトキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシンまたは病原性大腸菌易熱性トキシンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(4) トキシンのサブユニットがBサブユニットである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(5) ワクチンがインフルエンザワクチン、百日せきワクチン、日本脳炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンまたはマイコプラズマ

ワクチンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(6) ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットとの混合比率が1:0.001~1:10.000(重量比)である特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(7) 点鼻ワクチンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(8) 注射剤、スプレー剤または経口投与用形態の剤である特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はワクチン製剤に関する。更に詳しくは本発明はトキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤に関する。

〔従来の技術〕

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、数々の輝かしい成果をあげてきた。しかしながら、ワクチンの副作用や、また効果が充分でないとい

う例も多くあって、その対策が強く望まれている。副作用を軽減するにはワクチン自体の純度を高めることや、その使用量を少なくすることなどがあるが、それにより効果も小さくなるという避けられない問題がある。

〔発明が解決しようとする課題〕

現在ヒトに使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増殖させる媒体の成分がワクチンに混入することは避けられず、これがワクチン接種の際、副作用を引き起こす原因となる。また、免疫賦与に働く抗原部分そのものも多量に接種されると副作用を誘発する場合もある。

このようなことをできるだけ避け、副作用の起こりにくいワクチンに改善することが必要である。

上記のような課題を解決する方法として、ワクチンの接種量を減少することや、接種ルートを変えることなどがある。本発明者らは、ワクチンの使用量を減らしても免疫力は減少しないようにす

るため、ワクチンの免疫力を増強させる方法について種々検討した結果、細菌トキシンとくにコレラトキシン、ブドウ球菌 α トキシン、ブドウ球菌 δ トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、病原大腸菌易熱性トキシン(LT)そのもの、あるいは、それらのサブユニットをワクチンと共に使用することによって、ワクチンの免疫力を増強させることを見出した。また、ワクチンの接種ルートについても検討を行った。

本発明の目的は、ワクチンの使用量を減らすとともに、ワクチンの免疫力を減少させることなく、むしろ免疫力を増強させ得るようにしたワクチン製剤を提供するにある。

〔課題を解決するための手段〕

上記の如き課題を達成するための本発明のワクチン製剤は、トキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤を提供するにある。

トキシンが細菌トキシンであるワクチン製剤である。

細菌トキシンがコレラトキシン、ブドウ球菌 α

トキシン、ブドウ球菌 δ トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシンまたは病原性大腸菌易熱性トキシンであるワクチン製剤である。

トキシンのサブユニットがBサブユニットであるワクチン製剤である。

ワクチンがインフルエンザワクチン、百日せきワクチン、日本脳炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンまたはマイコプラズマワクチンであるワクチン製剤である。

ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットとの混合比率が1:0.001~1:10.000(重量比)であるワクチン製剤である。

点鼻ワクチンであるワクチン製剤である。

注射剤、スプレー剤または経口投与用形態の剤であるワクチン製剤である。

今、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを、細菌トキシンとしてコレラトキシン(CT)およびコレラトキシンBサブユニット(CTB)を例

にとって説明する。

鼻腔内に接種されたワクチンに対する局所免疫調節剤の一つとして、本発明者らは、ビブリオ・コレラ菌の産生する蛋白質トキシン、コレラトキシンに注目した。このトキシンは、小腸の粘膜に作用し、コレラ下痢症を引き起こす。また、このトキシンは、IgA抗体産生を誘導する強い免疫原であるばかりでなく、トキシンと同時に投与された他の蛋白質抗原に対する免疫応答を増強する免疫調節剤としても知られている。これらCTの効果は、CTが腸管細胞に対して細胞内のcAMPレベルを上げる作用によるらしい。この作用は、CTを構成するA、B2つのサブユニットのうち、CTBが細胞膜のGM₁ガングリオシドと結合し、コレラトキシンAサブユニットが細胞内に入ってアデニシルクラーゼを活性化することによっている。また、作用メカニズムは明らかでないが、CTの免疫増強作用は、それ自身に毒性がないと考えられているCTBと他の蛋白質抗原を腸内に同時に投与した時にも起こることが示されており、

有望な局所免疫応答の増強剤であるように思われる。これらの事実、CTおよびCTBが、腸粘膜においてばかりでなく、呼吸粘膜においても、より毒性が少ない形で、共存する抗原に対する局所免疫応答を増強する可能性を示唆している。

本発明者らは、マウスにおいて鼻腔内接種したHAワクチンに対する局所および血中抗体産生におよぼすCTおよびCTBの増強効果を検討した。また、ワクチン効果の増強剤としてのCTおよびCTBの有用性について検討した。

鼻腔内接種されたHAワクチンに対する免疫応答のCTBによる増強

マウスの鼻腔に接種されたHAワクチン(A/山形)に対する抗体産生と、それに及ぼすCTBの影響を検討した。同時に、鼻腔内接種の結果を、他のルートでの結果と比較した。抗体産生は、HAワクチン(2 μ g)を単独あるいはCTB(5 μ g)と共にマウス鼻腔内に滴下(あるいは腹腔、皮下に注射)後、4週目のマウスの血清および鼻腔洗浄液中の、それぞれHI抗体および抗HAワ

クチン-IgA、抗CTB-IgAを測定することによって決定した。第2表の結果から明らかなように、HAワクチンを単独で鼻腔内接種したときには、低いレベルのHI抗体しか検出されない。しかし、CTBと共に投与すると血中のHI抗体が、単独の場合よりも64倍高く検出された。また、鼻汁中にもHA-IgA、抗CTB-IgAが検出された。一方、腹腔や皮下接種した時、ワクチンのみの接種群でも血中に高いHI抗体が検出され、CTB共存下では更に4~8倍高い産生が見られた。しかし、鼻汁中には抗HA-IgAも抗CTB-IgAも共に殆ど検出されなかった。以上の結果は、CTBが、共存するHAワクチンに対する抗体産生を増強することを示している。また、鼻腔ルートでHAワクチンをCTBとともに接種した時にのみ局所の抗HA-IgA産生が増強されることを示している。第2表には示されていないが、血清中には抗HA-IgAは検出されなかった。

HAワクチンとCTBの鼻腔内接種後の一次抗

体産生の経過

鼻腔ルートでHAワクチン(A/山形; 2 μ g)とCTB(5 μ g)を接種し、マウスにおける抗体産生の経過を検討した。第1図に示されるように、CTBの存在下で血中のワクチンに対するHI抗体産生は、1週目から2週目にかけて急速に増加し、その後も4週目までゆっくりと増加し続けた。鼻汁中の全IgA量は、接種1週目から2週目にかけて非接種マウスの全IgA量の6倍位まで急速に増加し、最大レベルに達した。また、その中に含まれている抗HA-IgAは、1週目以後4週目までゆっくり増加し続けた。したがって、HAワクチンに対する局所の抗体は、CTBとワクチンを接種後、2週目位から検出されるようになる。

CTBのHAワクチンに対する一次および二次抗体産生増強作用とHAワクチン接種量の影響

CTB(5 μ g)とHAワクチン(A/山形)をマウスの鼻腔内に接種し抗体産生とワクチンの接種量の関係を検討した。抗体産生は、CTBと

ワクチン接種後4週目に一次抗体産生を、4週目にワクチン(2 μ g)のみをさらに二次接種して後2週目に二次抗体産生を検討した。第3表に示されているように、一次応答に関しては、ワクチンのみを接種した場合、接種量が8 μ gになっても低いレベルの抗体産生しか見られなかった。一方、CTBとワクチンを接種した場合には、接種量が0.03 μ gでも抗体産生が認められ、その増量に伴って血中のHI抗体、局所のHI-IgAは共に増加した。また、二次応答に関しては、ワクチンのみを一次接種したグループでも、一次接種量が増すにつれて、HI抗体、抗HA-IgAの増加がみられた。一方、CTBとワクチンを一次接種したグループでは、ワクチンの一次接種量によらず非常に高いHI抗体と抗HA-IgAの産生を示した。特に、局所の抗HA-IgA量は一次応答の数十倍に達した。これらの結果は、一次接種に用いられたCTBが、共存するワクチンの量に関係なく二次接種による抗体産生を非常によく誘導する作用があることを示している。

卵黄、CTBが、共に持つ比較的低濃度のワクチンに対しても、HAワクチンに対するメモリー効果を強く誘導する作用があることを示している。

CTBのHAワクチンに対する免疫応答増強作用と感染抵抗性

CTBによりHAワクチンに対する免疫応答は増強されるが、インフルエンザウイルス感染に対する抵抗が増加されるかどうかを、マウス馴化インフルエンザウイルスPR8株を用いて検討した。PR8株ウイルスHAワクチン(1.5 μ g)とCTB(5 μ g)を、マウスの鼻腔内に接種し、4週目にPR8株ウイルスを感染させた。感染3日後のマウス肺内のウイルス量を感染抵抗性の指標として測定した。その結果、第4表に示されるように、ワクチンとCTBを共に接種され、接種後4週目に高い血中のHI抗体と局所の抗HA-IgA抗体を産生しているマウスでは、肺中にウイルスが検出されず、インフルエンザウイルスに全く侵されていないことを示していた。

ウイルス感染後、3日目の肺内ウイルス量が感

染抵抗性の指標になり得ることを確かめるために、HAワクチンをCTBとともにマウスに接種し、4週目にPR8株ウイルスを感染させ、感染後のマウス肺内ウイルス量の変動を検討した。結果は、第2図に示されているように、感染3日後に肺内ウイルスが $<10^{0.5}$ のマウスでは感染1日目で既に肺内にウイルスが検出されず、その後、少なくとも8日後までその状態が持続し生存し続けた。一方、ワクチンに対する抗体産生が殆どみられなかった対照群では1日目に肺内のウイルス量の増加が見られ、3日目に最大ウイルス量に達した。これら対照群のマウスは感染6日目から死亡、非免疫マウスでは8日目には9匹中6匹の死亡が確かめられた。また生存したマウス3匹も肺内の病変が強く、数日以内に死亡するものと判断された。CTBのみ、あるいはHAワクチンのみを接種したマウスのグループでも非免疫マウスの場合と同様の結果であった。従って、ウイルス感染3日後の肺内ウイルス量が感染抵抗性の指標になることが明らかであった。

CTBあるいはCTのHAワクチンに対する免疫応答の増強と感染抵抗性

PR8株ウイルスHAワクチン(1.5 μ g)を種々な濃度のCTあるいはCTBと共に鼻腔内に接種し、4週後の抗体産生と、PR8株ウイルス感染に対する抵抗性を検討した。その結果、第5表に見られるように、CTBが0.05 μ gでも多少の感染抵抗性を示したが、5 μ gを添加した時に完全な防御を示した。また、感染抵抗性の増大は、ワクチンとCTB接種4週目の局所のIgAの増加や血中のHI抗体産生の増加と平行しているように思われる。一方、CTは0.05 μ g以上のどの濃度でも完全な感染防御をし、これらの条件下ではCT濃度の増加に伴って、血中のHI抗体や局所IgA抗体の増加が認められた。このことは、CTはCTBの方が1/10以下の濃度でも、完全な感染防御に必要な血中のHI抗体や局所のHA-IgAの産生を促進することができると示唆している。副作用に関する問題がなければ、CTBよりもCTの方が低濃度で有効

なアジュバントとして使えると思う。またこの実験結果から、PR8株ウイルス感染に対する完全な防御のためには、マウス血中にHI抗体が抗体価で32倍以上、鼻汁中に局所抗体が抗HA-IgAにして2単位以上存在することが必要であることを示唆している。各種細菌トキシンのアジュバント作用は第1表に示す通りである。

第 1 表

トキシンの種類	接 種 量		抗 体 産 生 HI (2°)	生残マウス数
	トキシソ (μ g/マウス)	インフルエンザHA (μ g/マウス)		
ブドウ球菌 α トキシソ	0.5	1.5	10.0 \pm 1.7	5/5
ブドウ球菌 δ トキシソ	5	1.5	<4	5/5
	0.5	1.5	<4	5/5
肺炎ヒブリオ菌耐熱性溶血トキシソ	5	1.5	11.5	5/5
	0.5	1.5	9.8 \pm 1.1	5/5
病原大腸菌易熱性トキシソ (LT)	5	1.5	11.8 \pm 0.4	5/5
	0.5	1.5	10.8 \pm 2.2	5/5
対 照	0	1.5	<4	0/5
			<4	0/5

第 2 表 コレラトキシソBサブユニット (CTB) によるインフルエンザHAワクチソ (A/山形) に対する抗体応答の増強と接種ルートによる増強効果の比較

グループ No.	接 種 条 件			接種4週間後の抗体応答		
	接種材料		接種ルート	局 所 (累計)		
	HAワクチソ (2 μ g)	CTB (5 μ g)		血中 HI抗体価 (2°)	抗HA-IgA (単位)	抗CTB-IgA (単位)
1	-	-	-	<2°	<0.2	<0.2
2	-	+	鼻腔	<2°	<0.2	8.3 \pm 0.3
3	+	-	鼻腔	2°	<0.2	<0.2
4	+	+	鼻腔	2''	3.3 \pm 0.3	7.4 \pm 1.1
5	+	-	腹腔	2°	<0.2	<0.2
6	+	+	腹腔	2''	<0.2	0.2
7	+	-	皮下	2°	<0.2	<0.2
8	+	+	皮下	2'' \pm 0.7	<0.2	0.2

第 3 表 CTBによるHAワクチンに対する一次および二次抗体応答の増強とHAワクチン接種量の影響

グループ No.	一次 鼻腔接種材料		一次刺激4週間後 の抗体応答		二次刺激(2 μ g HAワクチン 2週間後の抗体応答	
	HA	CTB	血中	局所(鼻汁)	血中	局所(鼻汁)
	(μ g)	(5 μ g)	HI抗体 (単位)	抗HA-IgA (単位)	HI抗体 (単位)	抗HA-IgA (単位)
1	-	-	<2 ^a	<0.2	2 ^a	<0.2
2	-	+	<2 ^a	<0.2	2 ^{a.5} \pm 0.7	1.2 \pm 1.2
3	0.03	-	<2 ^a	<0.2	2 ^a	2.9 \pm 1.6
4	0.5	-	<2 ^a	<0.2	2 ^{a.5} \pm 0.7	2.6 \pm 0.6
5	8	-	2 ^a	0.3 \pm 0.1	2 ^{a.5} \pm 0.7	4.5 \pm 2.1
6	0.03	+	2 ^a	0.7 \pm 0.3	2 ^{12.5} \pm 0.7	60 \pm 4
7	0.5	+	2 ^{a.5} \pm 0.7	2.5 \pm 0.4	2 ^{12.5} \pm 0.7	113 \pm 27
8	8	+	2 ^{11.5} \pm 0.7	4.6 \pm 0.3	2 ^{12.5} \pm 0.7	78 \pm 10

第 4 表 CTBによるHAワクチン(PR8株)に対する抗体応答の増強と感染抵抗性

グループ No.	鼻腔接種材料		接種4週間後の抗体応答		感染3日後の	罹患率 (%)
	HAワクチン	CTB	血中	局所(鼻汁)	マウス肺内ウ	
	(1.5 μ g)	(5 μ g)	HI抗体 (2 ^a)	抗HA-IgA (単位)	イルス量 EID ₅₀ (10 ^a)	
1	-	-	<2 ^a	<0.2	10 ^{4.2} \pm 0.5	5/5 (100)
2	-	+	<2 ^a	<0.2	10 ^{7.1} \pm 0.5	5/5 (100)
3	+	-	<2 ^a	<0.2	10 ^{5.7} \pm 0.5	5/5 (100)
4	+	+	2 ^{7.3} \pm 1.3	4.6 \pm 0.7	10 ^{6.5}	0/5 (0)

第 5 表 CTBあるいはCTによるHAワクチン (PR8株) に対する抗体応答の増強と感染抵抗性

グループ No.	鼻腔接種材料		血中 HI抗体価 (2°)	接種4週間後の抗体応答 局所 (鼻汁)		感染3日後のマ ウス肺内ウイル ス量 (ED ₅₀) (10 ⁻⁵)
	HAワクチン (1.5 μg)	CTB (CT) (μg)		抗HA-IgA (単位)	抗CTB-IgA (単位)	
1	-	-	<2°	<0.2	<0.2	10 ^{4.8}
2	-	CTB (5)	<2°	<0.2	6.2 ± 1.3	10 ^{7.1}
3	+	-	<2°	<0.2	<0.2	10 ^{5.7}
4	+	CTB (0.05)	<2°	0.5	<0.2	10 ^{5.9}
5	+	CTB (0.5)	2 ^{4.5} ± 2.7	1.2 ± 0.9	1.5 ± 1.0	10 ^{5.3}
6	+	CTB (5)	2 ^{4.5} ± 2.7	4.6 ± 0.7	3.7 ± 0.6	10 ^{4.5}
7	+	CT (0.05)	2°	2.0 ± 0.8	<0.2	10 ^{4.3}
8	+	CT (0.5)	2°	3.2 ± 0.6	0.6 ± 0.6	10 ^{4.3}
9	+	CT (5)	2 ^{4.5} ± 2.7	3.1 ± 0.1	2.7 ± 0.1	10 ^{4.3}

以上のことより次のことが明らかになった。

(1) CTおよびCTBは共存するインフルエンザ・HAワクチンに対する抗体産生を増強する。

(2) ワクチンをCTBとともに鼻腔ルートで接種すると、血中のHI抗体産生と共に局所 (鼻汁) の抗HA-IgA産生も増強される。一方、腹腔や皮下ルートで接種した場合には、局所のHA-IgA産生は殆ど見られない。しかし、血中には高いHI抗体産生が出現する。すなわち、CTBは接種ルートに関係なく抗体産生増強作用がある。この事実は後に述べるCT、CTB、ブドウ球菌α毒素、ブドウ球菌δトキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシンまたは病原大腸菌易熱性トキシン毒素と百日ぜきワクチン、B型肝炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン、ロタワクチン、マイコプラズマワクチンと混合投与するとき、これらワクチン単独投与より更に高い抗体価を得ることができることにつながる。換言すればトキシンお

よびそれらのサブユニットを使用することによって、ワクチン量を減少させることができ、副作用を軽減することができる。

(3) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで接種すると、局所の抗HA-IgAは2週目から4週目までその産生量が増加し続ける。

(4) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで一次接種した時の4週目の抗体産生は、接種に用いたワクチンの量に比例して増加する。

(5) ワクチンとCTBをマウス鼻腔ルートで一次接種した後、4週目にワクチンのみを同一ルートで二次接種すると、その2週後の二次抗体産生は、一次接種に用いたワクチンの量に拘らず非常に高くなる。即ち、CTBは共存する一次接種に用いたワクチンが低濃度の場合でも、ワクチンに二次刺激に対する非常に高い抗体産生を誘導する作用があった。したがって、CTBは、強いメモリー効果を誘導する作用がある。

(6) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで接種多量の血清抗体や局所HA-IgAを産生している接種

後4週目のマウスでは、インフルエンザに対する感染が成立しない。本発明者らが用いた条件では、血中のHI価が32倍以上、局所抗体が2単位以上を有するマウスでは、PR8ウイルス感染に対する防御が成立した。

(7) ワクチンと共に鼻腔ルートで接種されたとき、完全なウイルス感染防御に要する抗体産生誘導のために必要なCTBの量は、 μg のオーダーであった。一方、CTの場合、CTBの1/10以下の濃度でも完全な感染防御に必要な抗体産生を誘導した。

本発明において使用されるトキシンあるいはそのサブユニット、例えばCTまたはCTBは、公知のCTおよびCTB調製法に従って調製することができるが、いずれも市販されているので、それを用いることができる。CTは大量に動物に投与すると毒性を現すが、少量であれば鼻腔内（あるいは腹腔内）では問題がない。CTBはCTに比べて毒性が遙かに少なく鼻腔内投与では全く問題ない。更に、ブドウ球菌 α トキシン、ブド

ウ球菌 δ トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、病原大腸菌易熱性トキシンが挙げられる。

ワクチンとしては、インフルエンザワクチン、百日ぜきワクチン、B型肝炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン、ロタワクチン、マイコプラズマワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。これらのワクチンは、通常これらのワクチン製造法に従って製造可能である。各種ワクチンの製造法、性質を概略すると以下の通りである。

インフルエンザワクチン；発育鶏卵で増殖させたウイルスをエーテル、界面活性剤などで分解精製して得たあるいは遺伝子操作や化学合成によって得た血球凝集素(HA)、ノイラミニデース(NA)、核蛋白質(NP)、マトリックス蛋白質(M)あるいはその一部などを含むワクチン。

百日ぜきワクチン；百日ぜき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化したもの、または、遺

伝子操作や化学合成によって得た百日ぜき菌毒素(PT)、血球凝集素(FHA)、K-凝集素、あるいは、その一部などを含むワクチン。

日本脳炎ワクチン；マウス内で増殖したウイルスを超遠心あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活化したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原蛋白質。

B型肝炎ワクチン；B型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心を用いてHBs抗原を分離精製したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原部位。

麻しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。
風しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン；麻しん・風しん・おたふくかぜワクチンを混合したワクチン。

ロタワクチン；MA104細胞など培養細胞で増殖させたウイルスまたは患者の糞便中より得たウイルスあるいは遺伝子操作または化学合成など、または、その一部により得た感染防御抗原を含むワクチン。

マイコプラズマワクチン；マイコプラズマ液体培地で増殖したマイコプラズマ、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成などにより得られた感染防御抗原を含むワクチン。

上記ワクチンは液状または粉末状で供される。

勿論、これらワクチンはトキシンまたはそのサブユニットと共に投与されるときは液状の方が鼻腔内投与（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）や

注射の場合に通していることはいうまでもない。さらに、鼻腔内投与の場合は、粉末スプレー方式も可能である。投与量は、マウスの場合、鼻腔内で $5\mu\text{L}$ ～ $50\mu\text{L}$ 、ヒトの場合は鼻腔内投与、注射いずれも $0.1\sim 0.5\text{mL}$ が適当である。これらの量は勿論適宜変更し得ることはいうまでもない。

ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットの混合比率は、 $1:0.001\sim 1:10.000$ (重量比)であり、ワクチンの種類に応じたヒトの投与量に従えばよい。

本発明のワクチン製剤は、上記ワクチンにトキシンまたそのサブユニットを所定の量比で混合することにより調製される。調製は厳密に無菌的に行わなければならぬことはいうまでもなく、それぞれの原材料も完全に無菌的でなければならない。勿論、ワクチン作用以外に必要なないバイロジェンやアレルギー源となるような夾雑タンパクは可能な限り除去されねばならない。

本発明のワクチン製剤は、ワクチン自体とトキ

シンまたはそのサブユニットをそれぞれ別々に調製、製剤化しておき、用時に混合するか、または別々に同時に投与するという方法によっても、効果を発揮させることができる。

以下参考例としてインフルエンザワクチンとCTまたはCTBを混合した本発明のワクチン製剤の効果を示した実験例を挙げる。

参考例

動物：

Balb/c, 6～8週令の雌マウスを用いた。

HAワクチン：

精製ウイルスよりエーテル処理によって脂質成分を除去したものをHAワクチンとして用いた。このHAワクチン中にはHA成分が約30%含まれており、第2表～第5表に示す結果中のワクチンの接種量は、その中のHA量に換算して表記した。

CTおよびCTB

コレラトキシン(CT)とそのコレラトキシンBサブユニット(CTB)は共に市販品(米国、

シグマ社製)を購入して用いた。この実験で用いられたCTBには、SDSポリアクリルアミドゲルの電気泳動上でコレラトキシンAサブユニットの混入は認められなかった。

接種ルートおよび接種法：

接種材料はHAワクチンあるいはアジュバントをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で適当濃度に希釈し調製した。鼻腔ルートでの接種は、マウスをアモバルビタルナトリウムで麻酔後、左側鼻腔にマイクロピペットで $20\mu\text{L}$ の接種材料を滴下することによって行った。皮下ルートからの接種は麻酔条件下でマウス背部皮下に $100\mu\text{L}$ の接種材料を注射することにより行った。また、腹腔からの接種は、 $100\mu\text{L}$ の接種材料を注射することによって行った。

血液及び鼻汁の回収：

血液はエーテル麻酔条件下で、マウスの心臓より全採血によって、回収した。鼻汁は、放血後のマウスの左右の鼻孔より 1mL のPBSを2回づつ還流することによって回収した。

赤血球凝集抑制(HI)抗体価の測定：

HI価測定のための血清は先ずRDE(Receptor Destroying Enzyme)によって血清中の非特異的赤血球凝集抑制物質を除去した。次に、血清はU型マイクロタイタープレート上で2倍シリーズの希釈をし、16HAユニットのウイルスとともに混合し、30分間室温放置後、鶏赤血球を加えることによって、分析した。結果は、室温で1時間放置後、決定した。

抗HA IgA、抗CTB IgA、全IgA量の測定：

血清および鼻汁中の抗HA-IgA抗CTB IgA、全IgA量は酵素免疫測定法(ELISA)によって測定した。抗HA-IgAや抗CTB-IgAの定量の際には、コーティング緩衝液に懸濁したHAワクチン($5\mu\text{g}/\text{mL}$)やCTB($5\mu\text{L}/\text{mL}$) $50\mu\text{L}$ で、先ず96穴のEIAプレート(half-area, Costar, Cambridge, MA)各孔(well)をコートした。室温に2時間放置後、PBS

牛血清アルブミン (BSA) (及び 0.1% NaCl) を含む PBS、100 μ l で各孔をコートした。4℃ に一昼夜放置後、PBS-tween で洗浄し、各孔に血清あるいは鼻汁試料を 50 μ l ずつ入れた。室温に 2 時間放置後、PBS-tween で洗浄し、次に各孔に 50 μ l ずつ、PBS-tween で希釈したアルカリホスファターゼ結合の山羊抗マウス IgA (α の鎖特異性、1:1000、米国、ザメット ラボ社製) を加えた。室温に 1 時間放置後、PBS-tween で洗浄後、各孔に 100 μ l、pH 9.8 で 10% ジェタノールアミンを含む緩衝液に懸濁した p-ニトロフェニルフェート (1 mg/ml; シグマ社製) を加えた。室温で 20~30 分間放置後、発色を S Jeia オートリーダ (モデル、ER-8000、三光純薬社製) を使って OD₄₉₂ で測定した。検量線は、プレート毎に作り、各試料の値は、S Jeia オートリーダに内蔵されている二次の logit-log 方式によって回帰

では非免疫マウスの 90% 以上が 14 日目以内に死亡するか、あるいは肺内にコンソリデーションを形成した。

肺のウイルス量の測定:

感染後 3 日目のウイルスから肺を摘出し、乳鉢磨砕し、PBS で 10% 乳剤とした。それを 2500 回転で遠心した上清を、10 倍段階希釈後、それぞれの希釈液を孵化鶏卵 (5 個) に接種した。卵内でのウイルスの増殖は、漿尿液の赤血球凝集によって決定し、感染を示した卵に、接種した肺乳剤の最低希釈の価を EID₅₀ により決定し、マウスの肺ウイルス価とした。肺ウイルス価は平均値 (\pm SD) 表現した。実験によっては、1 群 5 匹のマウス肺をプールして肺乳剤を作り、その肺ウイルス価を決定した。

罹患率:

1 群 5 匹のマウスの 10% 肺乳剤中に、> 10⁴ のウイルスが検出されたマウスの数によって罹患率を示した。

統計処理:

した検量線に基いて決めた。抗 HA-IgA 定量の標準液としては、HA ワクチンを鼻腔内より 2 週間毎に 5 回接種したマウスの鼻汁を 8 単位と決めて用いた。また、抗 CTB-IgA 定量の標準液としては、CTB (5 μ g) を鼻腔内より接種し 4 週目のマウスの鼻汁 (IgA 量の多かったもの) を 8 単位と決めて使用した。全 IgA 量の定量には、先ず 1 μ g/ml の山羊抗マウス IgA を各孔に 50 μ l ずつ加える操作を除いて同様の操作を行った。全 IgA 定量の標準液としては、マウスの精製 IgA ミエローマ (米国、マイルス ラボラトリーズ社製) を用いた。

PR8 株ウイルスによるマウスの感染:

マウスをアモバルビタルナトリウムで麻酔し、ウイルスの 0.01% BSA を含む懸濁液をマウス左側鼻腔内に 20 μ l 滴下することにより、感染させた。PR8 株ウイルスは、フェレットで 148 代、マウスで 596 代、孵化鶏卵で 72 継代した感染価 10^{6.5} の漿尿液原液を、5,000~10,000 倍希釈して用いた。この感染条件

生体内感染実験における感染防御能の有意差は、Student's test によって検定された。

以下、本発明の実施例について詳細に説明するが、本発明は何らこれのみに限定されるものではない。

〔実施例〕

実施例 1

インフルエンザ HA ワクチン-CTB 製剤 (点鼻剤の調製)

インフルエンザ HA ワクチン (1 mg HA/ml) とリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過した CTB と混合し、1 ml 中のインフルエンザ HA ワクチン 1.5~2 μ l と、CTB 3.5~250 μ g を含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、インフルエンザ HA ワクチン-CTB 点鼻剤とした。本品は 10℃ 以下の冷暗所に保存する。実験成績は、前述の通り。

実施例 2インフルエンザHAワクチン-CTB製剤(注射剤)の調製

インフルエンザHAワクチン(1mg HA/ml)とリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBと混合し、1ml中にインフルエンザHAワクチン1.5~2μgと、CTB2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、インフルエンザHAワクチン-CTB注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所の保存する。実験成績は、前述の通り。

実施例 3B型肝炎ワクチン-CTB製剤(注射剤)の調製

B型肝炎ワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中HBs抗原40μg 蛋白質と、CTBを2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、B型

肝炎ワクチン-CTB注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所の保存する。

上記のように調製したB型肝炎ワクチンおよびCTをマウスに接種し、3週間後の血中抗体産生を調べた。

この成績から、B型肝炎ワクチンのみを接種されたマウスでは、 $2^{5.6}$ 単位(受身赤血球凝集反応で)であったのに対し、CTを添加したものは $10^{6.6}$ 単位であり、抗体産生が増強された。

B型肝炎ワクチンおよびCTを添加したときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価 P H A
C T	$2^{6.6}$
無添加	$2^{5.6}$

抗体価は受身赤血球凝集反応により測定した。

抗体価はマウス5頭の平均値。

実施例 4百日せきワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製

百日せきワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中に百日せきワクチン14μg蛋白質窒素と、CTBを2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、百日せきワクチン-CTB経鼻投与剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せきワクチン13μg蛋白質窒素1mlに、CTBおよびCTを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、抗PT抗体は、4.1国際単位以下であったのに対し、CTBを添加したものでは、140.3単位、CTを添加したものでは232.5単位と上昇した。抗FHA抗体では、ワクチンのみ

CTB添加、CT添加でそれぞれ2.6単位以下、32.0単位以下、43.9単位であり、CTBあるいはCTを添加したものは、ワクチンのみを接種した場合に比べ、著しく抗体産生が増強された。

百日せきワクチンにCTおよびCTBを添加したときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価	
	抗 P T	抗 F H A
C T	232.5	43.9
C T B	140.3	32.0
無添加	< 4.1	< 2.6

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はE L I S A 国際単位

日本脳炎ワクチン-CTB製剤（注射剤）の調製

日本脳炎ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中に日本脳炎 $10^{7.0}$ PFU相当量の不活化ウイルス粒子と、CTBを0.1~0.5 μ gを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、日本脳炎ワクチン-CTB注射製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した日本脳炎ワクチンおよびCTBあるいはCTを、1週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体量をみた。

その成績から、日本脳炎ワクチンのみを接種した場合に産生される中和抗体価は $10^{1.0}$ であったのに対し、CTB添加、CT添加は、それぞれ $10^{2.5}$ 以上、 $10^{2.5}$ 以上であり、CTB、CTを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

日本脳炎ワクチンにCTおよびCTB添加したときの抗体産生の増強

検 体	添 加 濃 度	中和抗体価 10 ⁿ
C T	0.05 μ g/MOUSE	3.39
	0.5 μ g	3.20
	5.0 μ g	3.52
C T B	0.05 μ g/MOUSE	2.58
	0.5 μ g	2.70
	5.0 μ g	3.39
無添加		1.88

抗体価はマウス10頭のプール血清の抗体価

実施例 6

麻しんワクチン-CTB製剤（点鼻剤）の調製

麻しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中に麻しんワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、麻しんワクチン-CTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から麻しんワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.144であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.209以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

麻しんワクチンにCTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	C T B	
麻しんワクチン20 μ g	5 μ g	0.21
対 照 20 μ g	5 μ g	0.144

実施例 7

風しんワクチン-CTB製剤（点鼻剤）の調製

風しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中にワクチン3 μ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-CTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した風しんワクチンおよびCTBを3週間で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみ投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.095であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.920以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

風しんワクチンにCTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA 価
抗 原	CTB	
風しんワクチン20 μ g	5 μ g	0.920
対 照 20 μ g	0 μ g	0.095

実施例 8

おたふくかぜワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製

おたふくかぜワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解

し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中にワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-CTB点鼻剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.028であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.045以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

おたふくかぜワクチンにCTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA価
抗 原	CTB	
おたふくかぜワクチン 20 μ g	5 μ g	0.05
対 照 20 μ g	0 μ g	0.028

実施例 9

麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製

麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中に各々のワクチン7 μ g、1 μ g、7 μ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-CTB点鼻剤を調製した。本品は1

0℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は麻疹・風しん・おたふくかぜの各々は、0.14、0.09、0.15であったのに対し、CTB添加ワクチンは、各々0.29、0.30、0.24以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

麻疹・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンにCTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	C T B	
麻しんワクチン 7 μ g	5 μ g	麻しん 0.29
風しんワクチン 7 μ g		風しん 0.30
おたふくかぜ ワクチン7 μ g		おたふく 0.24
対 照		麻しん 0.14 風しん 0.09 おたふく 0.15

実施例 10

ロタワクチン-C T B 製剤（経口、点鼻剤）の調製

ロタワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾

過したC T Bとを混合し、1 m l 中にワクチン3.3 μ g 相当量のウイルス粒子とC T Bを5 μ g を含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ロタワクチン-C T B 経口、点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したロタワクチンおよびC T Bを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から、ワクチンのみを投与した場合に産生されるE L I S A 抗体価は、点鼻接種の場合、0.089であったのに対し、C T B 添加ワクチンは0.281であり、また、経口接種の場合、0.018であったのに対し、C T B 添加ワクチンは0.227であり、いずれもC T B を添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

ロタワクチンにC T B を混合したときの抗体産生の増強

接 種 量					抗体産生
抗 原				C T B	
ロ タ ワ ク チ ン	点 鼻 接 種	ワ ク チ ン	3.3 μ g	5 μ g	0 . 2 8 1
		対 照	3.3 μ g	0 μ g	0 . 0 8 9
	経 口 接 種	ワ ク チ ン	3.3 μ g	5 μ g	0 . 2 2 7
		対 照	3.3 μ g	0 μ g	0 . 0 1 8

実施例 11

マイコプラズマワクチン-C T B 製剤（注射剤）の調製

マイコプラズマワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したC T Bとを混合し、1 m l 中にワクチン 2.0×10^{10} C F U（コロニー形成単位）相当量のマイコプラズマと、C T Bを10 μ g を含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-C T B 注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびC T Bを2週間隔で3回ニワトリに投与し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。

その成績からマイコプラズマワクチンのみを投与した場合に比べ、C T B 添加ワクチンは、ワクチンのみを接種した場合より著名に防御効果を示した。

実施例 12

風しんワクチン-L T B 製剤（点鼻剤）の調製

風しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL T Bとを混合し、1 m l 中にワクチン3

μg 相当量のウイルス粒子と、LTBを $5\mu\text{g}$ を含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-LTB点鼻製剤を調製した。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した風しんワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.133であったのに対し、LTB添加ワクチンは、0.854以上であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

風しんワクチンにLTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA 価
抗 原	L T B	
風しんワクチン $3\mu\text{g}$	$5\mu\text{g}$	0.854
対 照 3 μg	$0\mu\text{g}$	0.133

実施例 13

麻しんワクチン-LTB製剤（点鼻剤）の調製

麻しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、 1mL 中に麻しんワクチン $20\mu\text{g}$ 相当量のウイルス粒子と、LTBを $5\mu\text{g}$ を含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、麻しんワクチン-LTB点鼻剤を調製した。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生

をみた。

その成績から麻しんワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、0.182であったのに対し、LTB添加ワクチンは、0.332以上であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

麻しんワクチンにLTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA 価
抗 原	L T B	
麻しんワクチン $20\mu\text{g}$	$5\mu\text{g}$	0.332
対 照 20 μg	$0\mu\text{g}$	0.182

実施例 14

おたふくかぜワクチン-LTB製剤（点鼻剤）の調製

おたふくかぜワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、 1mL 中にワクチン $20\mu\text{g}$ 相当量のウイルス粒子と、LTBを $5\mu\text{g}$ を含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注し、ワクチン-LTB点鼻製剤を調製した。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.023であったのに対し、LTB添加ワクチンは、0.074以上であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

おたふくかぜワクチンにLTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	L T B	
おたふくかぜ ワクチン 20 μ g	5 μ g	0.074
対 照 20 μ g	0 μ g	0.023

実施例 15

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-L TB製剤（点鼻剤）の調製

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、1ml中に各々のワクチン7 μ g、1 μ g、7 μ g相当量のウイルス粒子と、LTBを5 μ g含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-LTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、麻しん、風しん、おたふくかぜの各々は、0.18、0.07、0.13であったのに対し、LTB添加ワクチンは、各々0.34、0.27、0.28以上であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンにL TBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	L T B	
麻しんワクチン 7 μ g	5 μ g	麻しん 0.34
風しんワクチン 1 μ g		風しん 0.27
おたふくかぜ ワクチン7 μ g		おたふく 0.28
対 照	0 μ g	麻しん 0.18
		風しん 0.07
		おたふく 0.13

実施例 16

ロタワクチン-LTB製剤（経口、点鼻剤）の調製

ロタワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBと混合し、1ml中にワクチン3.3 μ g相当量のウイルス粒子とLTBを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-LTB経口、点鼻製剤を調製した。本品は、10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から、ワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、点鼻接種の場合0.063であったのに対し、LTB添加ワクチンは、0.348以上であり、経口接種の場合は0.024であったのに対し、LTB添加ワクチンは0.177であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

ロタワクチンにLTBを混合したときの抗体産生の増強

接 種 量				抗体産生 E L I S A 価	
抗 原			L T B		
ロ タ ワ ク チ ン	点 鼻 接 種	ワクチン	3.3 μg	5 μg	0.348
		対照	3.3 μg	0 μg	0.063
	経 口 接 種	ワクチン	3.3 μg	5 μg	0.177
		対照	3.3 μg	0 μg	0.024

実施例 17

マイコプラズマワクチン-LTB製剤（注射剤）の調製

マイコプラズマワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、1ml中にワクチン 2.0×10^{10} CFU（コロニー形成単位）相当量のマイコプラズマと、LTBを5μgを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-LTB注射製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびLTBを2週間隔で3回ニワトリに投与し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。

その成績からマイコプラズマワクチンのみを投与した場合に比べ、LTB添加ワクチンは、ワクチンのみを接種した場合より著しく防御効果を示した。

マイコプラズマワクチンにLTBを添加したときの攻撃に対する病変の減少

接 種 量			病 変	
抗 原		L T B		
*** 全菌体 1.0×10^{10} CFU		5 μg	* 3/12	** 1.23
超音波 処理 1.0×10^{10} CFU		5 μg	2/11	1.27
対照 1.0×10^{10} CFU		0 μg	10/10	2.77

*分母は被検動物数、分子は病変を認めたもの

**被検各群の病変の平均値

***コロニー形成単位

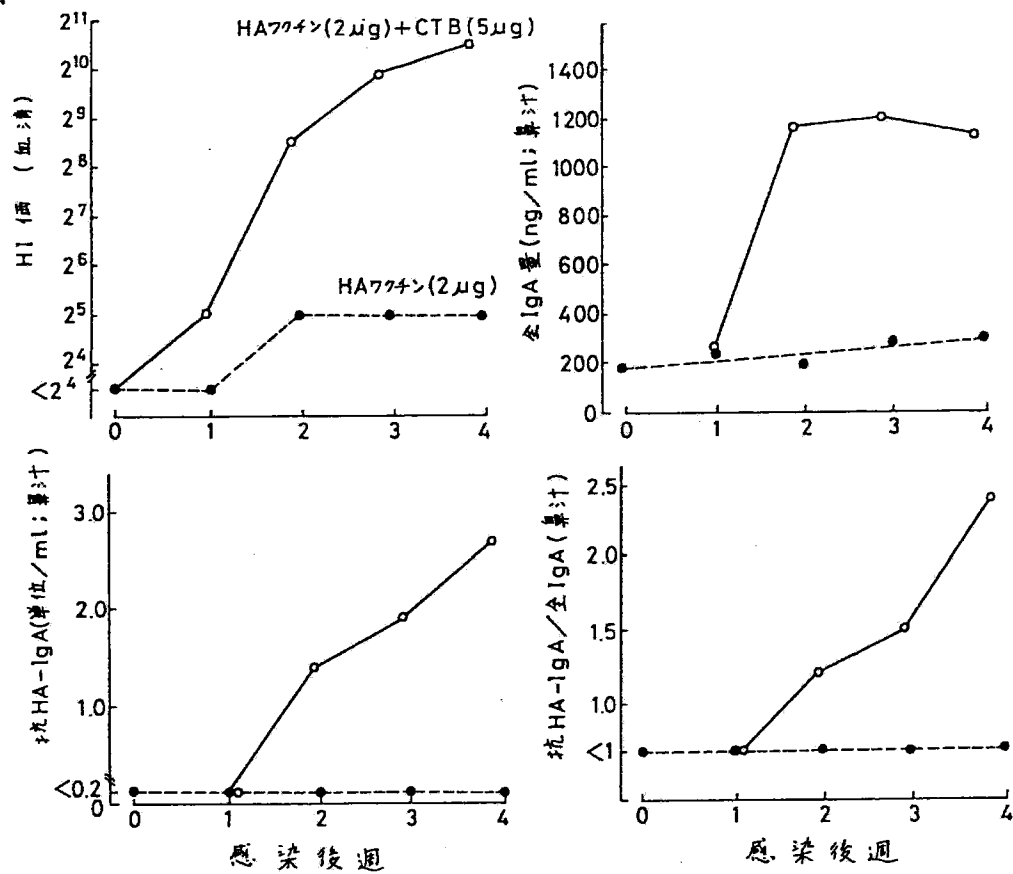
4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明のワクチン製剤投与後の一次抗体

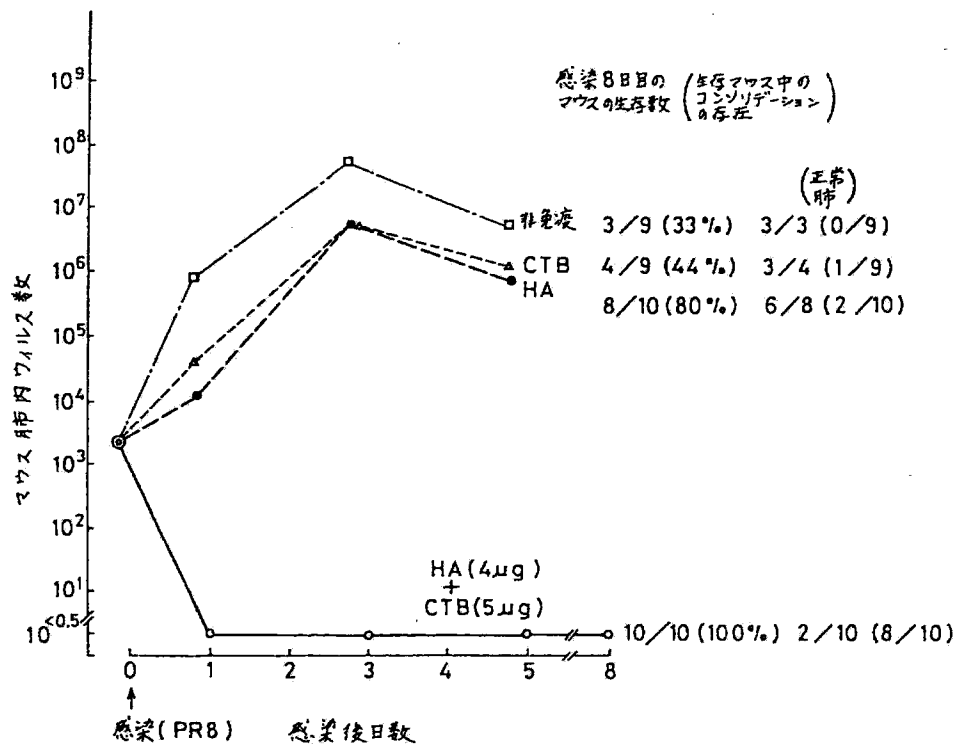
産生応答の経過を示し、

第2図は本発明のワクチン製剤投与による肺内ウイルス感染数の変動を示す。

第 1 図



第 2 図



手続補正書

平成1年 3月 3日

特許庁長官 殿



1. 事件の表示

平成 1年特許願第6759号

2. 発明の名称

ワクチン製剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都港区白金5丁目9番1号

名称 北里研究所(社団法人)

代表者 水之江 公英

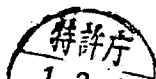
4. 代理人 〒170

東京都豊島区北大塚2-25-1

太陽生命大塚ビル3階 電話(917)1917

(7528) 弁理士 小林 和 憲

(ほか1名)



訂正 明 細 書

1. 発明の名称

ワクチン製剤

2. 特許請求の範囲

(1) トキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤。

(2) トキシンが細菌トキシンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(3) 細菌トキシンがコレラトキシン、ブドウ球菌αトキシン、ブドウ球菌δトキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、百日せきトキシンまたは病原性大腸菌腸熱性トキシンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(4) トキシンのサブユニットがBサブユニットである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(5) ワクチンがインフルエンザワクチン、百日せきワクチン、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふ

5. 補正命令の日付

自発

6. 補正の対象

(1) 明細書の特許請求の範囲の欄

(2) 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

別紙の全文訂正明細書の通り訂正します。

くかぜ混合ワクチンまたはマイコプラズマワクチンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(6) ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットとの混合比率が1:0.0001~1:10.000(重量比)である特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(7) 点鼻ワクチンである特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

(8) 注射剤、スプレー剤または経口投与用形態の剤である特許請求の範囲第1項記載のワクチン製剤。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明はワクチン製剤に関する。更に詳しくは本発明はトキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤に関する。

[従来の技術]

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、数々の輝かしい成果をあげてきた。しかしながら、

ワクチンの副作用や、また効果が充分でないという例も多くあって、その対策が強く望まれている。副作用を軽減するにはワクチン自体の純度を高めることや、その使用量を少なくすることなどがあるが、それにより効果も小さくなるという避けられない問題がある。

〔発明が解決しようとする課題〕

現在ヒトに使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増殖させる媒体の成分がワクチンに混入することは避けられず、これがワクチン接種の際、副作用を引き起こす原因となる。また、免疫賦与に働く抗原部分そのものも多量に接種されると副作用を誘発する場合もある。

このようなことをできるだけ避け、副作用の起こりにくいワクチンに改善することが必要である。

上記のような課題を解決する方法として、ワクチンの接種量を減少することや、接種ルートを変えることなどがある。本発明者らは、ワクチンの

使用量を減らしても免疫力は減少しないようにするため、ワクチンの免疫力を増強させる方法について種々検討した結果、細菌トキシンとくにコレラトキシン、ブドウ球菌 α トキシン、ブドウ球菌 δ トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、百日せきトキシン、病原大腸菌易熱性トキシン(LT)そのもの、あるいは、それらのサブユニットをワクチンと共に使用することによって、ワクチンの免疫力を増強させることを見出した。また、ワクチンの接種ルートについても検討を行った。

本発明の目的は、ワクチンの使用量を減らすとともに、ワクチンの免疫力を減少させることなく、むしろ免疫力を増強させ得るようにしたワクチン製剤を提供するにある。

〔課題を解決するための手段〕

上記の如き課題を達成するための本発明のワクチン製剤は、トキシンまたはそのサブユニットを有効成分とするワクチン製剤を提供するにある。

トキシンが細菌トキシンであるワクチン製剤で

ある。

細菌トキシンがコレラトキシン、ブドウ球菌 α トキシン、ブドウ球菌 δ トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、百日せきトキシンまたは病原性大腸菌易熱性トキシンであるワクチン製剤である。

トキシンのサブユニットがBサブユニットであるワクチン製剤である。

ワクチンがインフルエンザワクチン、百日せきワクチン、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンまたはマイコプラズマワクチンであるワクチン製剤である。

ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットとの混合比率が1:0.0001~1:10.000(重量比)であるワクチン製剤である。

点鼻ワクチンであるワクチン製剤である。

注射剤、スプレー剤または経口投与形態の剤

であるワクチン製剤である。

今、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを、細菌トキシンとしてコレラトキシン(CT)およびコレラトキシンBサブユニット(CTB)を例にとって説明する。

鼻腔内に接種されたワクチンに対する局所免疫調節剤の一つとして、本発明者らは、ビブリオ・コレラ菌の産生する蛋白質トキシン、コレラトキシンに注目した。このトキシンは、小腸の粘膜に作用し、コレラ下痢症を引き起こす。また、このトキシンは、IgA抗体産生を誘導する強い免疫原であるばかりでなく、トキシンと同時に投与された他の蛋白質抗原に対する免疫応答を増強する免疫調節剤としても知られている。これらCTの効果は、CTが腸管細胞に対して細胞内のcAMPレベルを上げる作用によるらしい。この作用は、CTを構成するA、B2つのサブユニットのうち、CTBが細胞膜のGM₁ガングリオシドと結合し、コレラトキシンAサブユニットが細胞内に入ってアデニシルクラーゼを活性化することによってい

る。また、作用メカニズムは明らかでないが、CTの免疫増強作用は、それ自身に毒性がないと考えられているCTBと他の蛋白質抗原を腸内に同時に投与した時にも起こることが示されており、有望な局所免疫応答の増強剤であるように思われる。これらの事実、CTおよびCTBが、腸粘膜においてばかりでなく、呼吸粘膜においても、より毒性が少ない形で、共存する抗原に対する局所免疫応答を増強する可能性を示唆している。

本発明者らは、マウスにおいて鼻腔内接種したHAワクチンに対する局所および血中抗体産生におよぼすCTおよびCTBの増強効果を検討した。また、ワクチン効果の増強剤としてのCTおよびCTBの有用性について検討した。

鼻腔内接種されたHAワクチンに対する免疫応答のCTBによる増強

マウスの鼻腔に接種されたHAワクチン(A/山形)に対する抗体産生と、それに及ぼすCTBの影響を検討した。同時に、鼻腔内接種の結果を、他のルートでの結果と比較した。抗体産生は、H

Aワクチン(2 μ g)を単独あるいはCTB(5 μ g)と共にマウス鼻腔内に滴下(あるいは腹腔、皮下に注射)後、4週目のマウスの血清および鼻腔洗浄液中の、それぞれHI抗体および抗HAワクチン-IgA、抗CTB-IgAを測定することによって決定した。第2表の結果から明らかなように、HAワクチンを単独で鼻腔内接種したときには、低いレベルのHI抗体しか検出されない。しかし、CTBと共に投与すると血中のHI抗体が、単独の場合よりも64倍高く検出された。また、鼻汁中にもHA-IgA、抗CTB-IgAが検出された。一方、腹腔や皮下接種した時、ワクチンのみの接種群でも血中に高いHI抗体が検出され、CTB共存下では更に4~8倍高い産生が見られた。しかし、鼻汁中には抗HA-IgAも抗CTB-IgAも共に殆ど検出されなかった。以上の結果は、CTBが、共存するHAワクチンに対する抗体産生を増強することを示している。また、鼻腔ルートでHAワクチンをCTBとともに接種した時のみ局所の抗HA-IgA産生が

増強されることを示している。第2表には示されていないが、血清中には抗HA-IgAは検出されなかった。

HAワクチンとCTBの鼻腔内接種後の一次抗体産生の経過

鼻腔ルートでHAワクチン(A/山形; 2 μ g)とCTB(5 μ g)を接種し、マウスにおける抗体産生の経過を検討した。第1図に示されるように、CTBの存在下で血中のワクチンに対するHI抗体産生は、1週目から2週目にかけて急速に増加し、その後も4週目までゆっくりと増加し続けた。鼻汁中の全IgA量は、接種1週目から2週目にかけて非接種マウスの全IgA量の6倍位まで急速に増加し、最大レベルに達した。また、その中に含まれている抗HA-IgAは、1週目以後4週目までゆっくり増加し続けた。したがって、HAワクチンに対する局所の抗体は、CTBとワクチンを接種後、2週目位から検出されるようになる。

CTBのHAワクチンに対する一次および二次

抗体産生増強作用とHAワクチン接種量の影響

CTB(5 μ g)とHAワクチン(A/山形)をマウスの鼻腔内に接種し抗体産生とワクチンの接種量の関係を検討した。抗体産生は、CTBとワクチン接種後4週目に一次抗体産生を、4週目にワクチン(2 μ g)のみをさらに二次接種して後2週目に二次抗体産生を検討した。第3表に示されているように、一次応答に関しては、ワクチンのみを接種した場合、接種量が8 μ gになっても低いレベルの抗体産生しか見られなかった。一方、CTBとワクチンを接種した場合には、接種量が0.03 μ gでも抗体産生が認められ、その増量に伴って血中のHI抗体、局所のHI-IgAは共に増加した。また、二次応答に関しては、ワクチンのみを一次接種したグループでも、一次接種量が増すにつれて、HI抗体、抗HA-IgAの増加がみられた。一方、CTBとワクチンを一次接種したグループでは、ワクチンの一次接種量によらず非常に高いHI抗体と抗HA-IgAの産生を示した。特に、局所の抗HA-IgA量

は一次応答の数十倍に達した。これらの結果は、一次接種に用いられたCTBが、共存するワクチンの量に関係なく二次接種による抗体産生を非常に強く誘導する作用があることを示している。即ち、CTBが、共存する比較的低濃度のワクチンに対しても、HAワクチンに対するメモリー効果を強く誘導する作用があることを示している。

CTBのHAワクチンに対する免疫応答増強作用と感染抵抗性

CTBによりHAワクチンに対する免疫応答は増強されるが、インフルエンザウイルス感染に対する抵抗が増加されるかどうかを、マウス馴化インフルエンザウイルスPR8株を用いて検討した。PR8株ウイルスHAワクチン(1.5 μ g)とCTB(5 μ g)を、マウスの鼻腔内に接種し、4週目にPR8株ウイルスを感染させた。感染3日後のマウス肺内のウイルス量を感染抵抗性の指標として測定した。その結果、第4表に示されるように、ワクチンとCTBを共に接種され、接種後4週目に高い血中のHI抗体と局所の抗HA-

IgA抗体を産生しているマウスでは、肺中にウイルスが検出されず、インフルエンザウイルスに全く侵されていないことを示していた。

ウイルス感染後、3日目の肺内ウイルス量が感染抵抗性の指標になり得ることを確かめるために、HAワクチンをCTBとともにマウスに接種し、4週目にPR8株ウイルスを感染させ、感染後のマウス肺内ウイルス量の変動を検討した。結果は、第2図に示されているように、感染3日後に肺内ウイルスが $<10^{0.5}$ のマウスでは感染1日目で既に肺内にウイルスが検出されず、その後、少なくとも8日後までその状態が持続し生存し続けた。一方、ワクチンに対する抗体産生が殆どみられなかった対照群では1日目に肺内のウイルス量の増加が見られ、3日目に最大ウイルス量に達した。これら対照群のマウスは感染6日目から死亡、非免疫マウスでは8日目には9匹中6匹の死亡が確かめられた。また生存したマウス3匹も肺内の病変が強く、数日以内に死亡するものと判断された。CTBのみ、あるいはHAワクチンのみを接種し

たマウスのグループでも非免疫マウスの場合と同様の結果であった。従って、ウイルス感染3日後の肺内ウイルス量が感染抵抗性の指標になることが明らかであった。

CTBあるいはCTのHAワクチンに対する免疫応答の増強と感染抵抗性

PR8株ウイルスHAワクチン(1.5 μ g)を種々な濃度のCTあるいはCTBと共に鼻腔内接種し、4週後の抗体産生と、PR8株ウイルス感染に対する抵抗性を検討した。その結果、第5表に見られるように、CTBが0.05 μ gでも多少の感染抵抗性を示したが、5 μ gを添加した時に完全な防御を示した。また、感染抵抗性の増大は、ワクチンとCTB接種4週目の局所のIgAの増加や血中のHI抗体産生の増加と平行しているように思われる。一方、CTは0.05 μ g以上のどの濃度でも完全な感染防御をし、これらの条件下ではCT濃度の増加に伴って、血中のHI抗体や局所IgA抗体の増加が認められた。このことは、CTはCTBの方が1/10以下の濃

度でも、完全な感染防御に必要な血中のHI抗体や局所のHA-IgAの産生を促進することができていることを示唆している。副作用に関する問題がなければ、CTBよりもCTの方が低濃度で有効なアジュバントとして使える。またこの実験結果から、PR8株ウイルス感染に対する完全な防御のためには、マウス血中にHI抗体が抗体価で32倍以上、鼻汁中に局所抗体が抗HA-IgAにして2単位以上存在することが必要であることを示唆している。各種細菌トキシンのアジュバント作用は第1表に示す通りである。

第 1 表

トキシンの種類	接 種 量		抗 体 産 生 H I (2°)	生残マウス数
	トキシン (μ g/マウス)	インフルエンザHA (μ g/マウス)		
ブドウ球菌 α トキシン	0.5	1.5	10.0 \pm 1.7	5/5
ブドウ球菌 δ トキシン	5	1.5	<4	5/5
	0.5	1.5	<4	5/5
腸炎ヒブリオ菌耐熱性溶血トキシン	5	1.5	11.5	5/5
	0.5	1.5	9.8 \pm 1.1	5/5
病原大腸菌易熱性トキシン (LT)	5	1.5	11.8 \pm 0.4	5/5
	0.5	1.5	10.8 \pm 2.2	5/5
百日せきトキシン	5	1.5	11.6 \pm 0.5	5/5
	0.5	1.5	10.2 \pm 1.7	5/5
対 照	0	1.5	<4	0/5
			<4	0/5

第 2 表 コレラトキシンBサブユニット (CTB) によるインフルエンザHAワクチン (A/山形) に対する抗体応答の増強と接種ルートによる増強効果の比較

グループ No.	接 種 条 件			接種4週間後の抗体応答		
	接種材料		接種ルート	局 所 (鼻汁)		
	HAワクチン (2 μ g)	CTB (5 μ g)		血中 H I 抗体価 (2°)	抗HA-IgA (単位)	抗CTB-IgA (単位)
1	-	-	-	<2°	<0.2	<0.2
2	-	+	鼻腔	<2°	<0.2	8.3 \pm 0.3
3	+	-	鼻腔	2°	<0.2	<0.2
4	+	+	鼻腔	2''	3.3 \pm 0.3	7.4 \pm 1.1
5	+	-	腹腔	2°	<0.2	<0.2
6	+	+	腹腔	2''	<0.2	0.2
7	+	-	皮下	2°	<0.2	<0.2
8	+	+	皮下	2'' \pm 0.7	<0.2	0.2

第 3 表 CTBによるHAワクチンに対する一次および二次抗体応答の増強とHAワクチン接種量の影響

グループ No.	一次 鼻腔接種材料		一次刺激4週間後 の抗体応答		二次刺激 (2 μ g HAワクチン 2週間後の抗体応答	
	HA (μ g)	CTB (5 μ g)	血中 HI抗体 (単位)	局所 (鼻汁) 抗HA-IgA (単位)	血中 HI抗体 (単位)	局所 (鼻汁) 抗HA-IgA (単位)
1	-	-	<2 ^a	<0.2	2 ^b	<0.2
2	-	+	<2 ^a	<0.2	2 ^{b,c} \pm 0.7	1.2 \pm 1.2
3	0.03	-	<2 ^a	<0.2	2 ^b	2.9 \pm 1.6
4	0.5	-	<2 ^a	<0.2	2 ^{b,c} \pm 0.7	2.6 \pm 0.6
5	8	-	2 ^b	0.3 \pm 0.1	2 ^{b,c} \pm 0.7	4.5 \pm 2.1
6	0.03	+	2 ^a	0.7 \pm 0.3	2 ^{b,c} \pm 0.7	6.0 \pm 4
7	0.5	+	2 ^{b,c} \pm 0.7	2.5 \pm 0.4	2 ^{b,c} \pm 0.7	11.3 \pm 2.7
8	8	+	2 ^{b,c} \pm 0.7	4.6 \pm 0.3	2 ^{b,c} \pm 0.7	7.8 \pm 1.0

第 4 表 CTBによるHAワクチン (PR8株) に対する抗体応答の増強と感染抵抗性

グループ No.	鼻腔接種材料		接種4週間後の抗体応答		感染3日後の マウス肺内ウ イルス量 EID ₅₀ (10 ^a)	罹患率 (%)
	HAワクチン (1.5 μ g)	CTB (5 μ g)	血中 HI抗体 (2 ^a)	局所 (鼻汁) 抗HA-IgA (単位)		
1	-	-	<2 ^a	<0.2	10 ^{a,b} \pm 0.5	5/5 (100)
2	-	+	<2 ^a	<0.2	10 ^{b,c} \pm 0.5	5/5 (100)
3	+	-	<2 ^a	<0.2	10 ^{b,c} \pm 0.5	5/5 (100)
4	+	+	2 ^{b,c} \pm 1.3	4.6 \pm 0.7	10 ^{c,d}	0/5 (0)

第 5 表 CTBあるいはCTによるHAワクチン (PR8株) に対する抗体産生の増強と感染抵抗性

グループ No.	接種材料		接種4週間後の抗体産生			感染3日後のマウス肺内ウイルス量 (ED ₅₀) (10 ⁴)
	HAワクチン (1.5 μg)	CTB (CT) (μg)	血中 HI抗体価 (2 ⁺)	局所 (鼻汁)		
				抗HA-IgA (単位)	抗CTB-IgA (単位)	
1	-	-	<2 ⁺	<0.2	<0.2	10 ^{4.0}
2	-	CTB (5)	<2 ⁺	<0.2	6.2±1.3	10 ^{7.1}
3	+	-	<2 ⁺	<0.2	<0.2	10 ^{4.7}
4	+	CTB (0.05)	<2 ⁺	0.5	<0.2	10 ^{4.9}
5	+	CTB (0.5)	2 ^{4.5} ± 0.7	1.2 ± 0.9	1.5 ± 1.0	10 ^{2.5}
6	+	CTB (5)	2 ^{4.5} ± 0.7	4.6 ± 0.7	3.7 ± 0.6	10 ^{4.5}
7	+	CT (0.05)	2 ³	2.0 ± 0.8	<0.2	10 ^{4.5}
8	+	CT (0.5)	2 ⁷	3.2 ± 0.6	0.6 ± 0.6	10 ^{4.5}
9	+	CT (5)	2 ^{4.5} ± 0.7	3.1 ± 0.1	2.7 ± 0.1	10 ^{4.5}

以上のことより次のことが明らかになった。

(1) CTおよびCTBは共存するインフルエンザ・HAワクチンに対する抗体産生を増強する。

(2) ワクチンをCTBとともに鼻腔ルートで接種すると、血中のHI抗体産生と共に局所 (鼻汁) の抗HA-IgA産生も増強される。一方、腹腔や皮下ルートで接種した場合には、局所のHA-IgA産生は殆ど見られない。しかし、血中には高いHI抗体産生が出現する。すなわち、CTBは接種ルートに関係なく抗体産生増強作用がある。この事実は後に述べるCT、CTB、ブドウ球菌α毒素、ブドウ球菌δ毒素、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血毒素、百日せき毒素または病原大腸菌易熱性毒素と百日せきワクチン、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン、B型肝炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン、ロタワクチン、マイコプラズマワクチンと混合投与するとき、これらワクチン単独投与より更に高い

抗体価を得ることができることにつながる。換言すればトキシンおよびそれらのサブユニットを使用することによって、ワクチン量を減少させることができ、副作用を軽減することができる。

(3) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで接種すると、局所の抗HA-IgAは2週目から4週目までその産生量が増加し続ける。

(4) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで一次接種した時の4週目の抗体産生は、接種に用いたワクチンの量に比例して増加する。

(5) ワクチンとCTBをマウス鼻腔ルートで一次接種した後、4週目にワクチンのみを同一ルートで二次接種すると、その2週後の二次抗体産生は、一次接種に用いたワクチンの量に拘らず非常に高くなる。即ち、CTBは共存する一次接種に用いたワクチンが低濃度の場合でも、ワクチンに二次刺激に対する非常に高い抗体産生を誘導する作用があった。したがって、CTBは、強いメモリー効果を誘導する作用がある。

(6) ワクチンとCTBを鼻腔ルートで接種多量の

血清抗体や局所 H A - I g A を産生している接種後 4 週目のマウスでは、インフルエンザに対する感染が成立しない。本発明者らが用いた条件では、血中の H I 価が 3 2 倍以上、局所抗体が 2 単位以上を有するマウスでは、P R 8 ウイルス感染に対する防御が成立した。

(7) ワクチンと共に鼻腔ルートで接種されたとき、完全なウイルス感染防御に要する抗体産生誘導のために必要な C T B の量は、 μg のオーダーであった。一方、C T の場合、C T B の 1 / 1 0 以下の濃度でも完全な感染防御に必要な抗体産生を誘導した。

本発明において使用されるトキシンあるいはそのサブユニット、例えば C T または C T B は、公知の C T および C T B 調製法に従って調製することができるが、いずれも市販されているので、それを用いることができる。C T は大量に動物に投与すると毒性を現すが、少量であれば鼻腔内（あるいは腹腔内）では問題がない。C T B は C T に比べて毒性が遙かに少なく鼻腔内投与では全

く問題ない。更に、ブドウ球菌 α トキシン、ブドウ球菌 δ トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、百日せきトキシン、病原大腸菌易熱性トキシンが挙げられる。

ワクチンとしては、インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン、B 型肝炎ワクチン、日本脳炎ワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン、ロタワクチン、マイコプラズマワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。これらのワクチンは、通常のこれらワクチン製造法に従って製造可能である。各種ワクチンの製造法、性質を概略すると以下の通りである。

インフルエンザワクチン；発育鶏卵で増殖させたウイルスをエーテル、界面活性剤などで分解精製して得たあるいは遺伝子操作や化学合成によって得た血球凝集素（H A）、ノイラミニデース（N A）、核蛋白質（N P）、マトリックス蛋白質（M）あるいはその一部などを含むワクチン。

百日せきワクチン；百日せき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化したもの、または、遺伝子操作や化学合成によって得た百日せき菌毒素（P T）、血球凝集素（F H A）、K - 凝集素、あるいは、その一部などを含むワクチン。

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン；百日せきワクチンにジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドを混合したワクチン。

日本脳炎ワクチン；マウス 内で増殖したウイルスを超遠心あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活化したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原蛋白質あるいはその一部を含むワクチン。

B 型肝炎ワクチン；B 型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心を用いて H B s 抗原を分離精製したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原蛋白質あるいはその一部を含むワクチン。

麻しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。
風しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。
おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン；
麻しん・風しん・おたふくかぜワクチンを混合したワクチン。

ロタワクチン；M A 1 0 4 細胞など培養細胞で増殖させたウイルスまたは患者の糞便中より得たウイルスあるいは遺伝子操作または化学合成など、または、その一部により得た感染防御抗原を含むワクチン。

マイコプラズマワクチン；マイコプラズマ液体培地で増殖したマイコプラズマ、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成などにより得られた感染防御抗原を含むワクチン。

上記ワクチンは液状また粉末状で供される。

勿論、これらワクチンはトキシンまたはそのサブユニットと共に投与されるときは液状の方が鼻腔内投与（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）や注射の場合に適していることはいうまでもない。さらに、鼻腔内投与の場合は、粉末スプレー方式も可能である。投与量は、マウスの場合、鼻腔内で $5\mu\text{l}$ ～ $50\mu\text{l}$ 、ヒトの場合は鼻腔内投与、注射いずれも $0.1\sim 0.5\text{ml}$ が適当である。これらの量は勿論適宜変更し得ることはいうまでもない。

ワクチンとトキシンまたはそのサブユニットの混合比率は、 $1:0.0001\sim 1:10,000$ （重量比）であり、ワクチンの種類に応じたヒトの投与量に従えばよい。

本発明のワクチン製剤は、上記ワクチンにトキ

シンまたそのサブユニットを所定の量比で混合することにより調製される。調製は厳密に無菌的に行わなければならぬことはいうまでもなく、それぞれの原材料も完全に無菌的でなければならない。勿論、ワクチン作用以外に必要なバイロジェンやアレルギー源となるような夾雑タンパクは可能な限り除去されねばならない。

本発明のワクチン製剤は、ワクチン自体とトキシンまたはそのサブユニットをそれぞれ別々に調製、製剤化しておき、用時に混合するか、または別々に同時に投与するという方法によっても、効果を発揮させることができる。

以下参考例としてインフルエンザワクチンとCTまたはCTBを混合した本発明のワクチン製剤の効果を示した実験例を挙げる。

参考例

動物：

Balb/c, 6～8週令の雌マウスを用いた。

HAワクチン：

精製ウイルスよりエーテル処理によって脂質成

分を除去したものをHAワクチンとして用いた。このHAワクチン中にはHA成分が約30%含まれており、第2表～第5表に示す結果中のワクチンの接種量は、その中のHA量に換算して表記した。

CTおよびCTB

コレラトキシン（CT）とそのコレラトキシンBサブユニット（CTB）は共に市販品（米国、シグマ社製）を購入して用いた。この実験で用いられたCTBには、SDSポリアクリルアミドゲルの電気泳動上でコレラトキシンAサブユニットの混入は認められなかった。

接種ルートおよび接種法：

接種材料はHAワクチンあるいはアジュバントをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で適当濃度に希釈し調製した。鼻腔ルートでの接種は、マウスをアモバルビタールナトリウムで麻酔後、左側鼻腔にマイクロピペットで $20\mu\text{l}$ の接種材料を滴下することによって行った。皮下ルートからの接種は麻酔条件下でマウス背部皮下に $100\mu\text{l}$ の

接種材料を注射することによって行った。また、腹腔からの接種は、 $100\mu\text{l}$ の接種材料を注射することによって行った。

血液及び鼻汁の回収：

血液はエーテル麻酔条件下で、マウスの心臓より全採血によって、回収した。鼻汁は、放血後のマウスの左右の鼻孔より 1ml のPBSを2回づつ還流することによって回収した。

赤血球凝集抑制（HI）抗体価の測定：

HI価測定のための血清はまずRDE（Receptor Destroying Enzyme）によって血清中の非特異的赤血球凝集抑制物質を除去した。次に、血清はU型マイクロタイタープレート上で2倍シリーズの希釈をし、16HAユニットのウイルスとともに混合し、30分間室温放置後、鶏赤血球を加えることによって、分析した。結果は、室温で1時間放置後、決定した。

抗HA IgA、抗CTB IgA、全IgA量の測定：

血清および鼻汁中の抗HA-IgA抗CTB I

g A、全IgA量は酵素免疫測定法(ELISA)によって測定した。抗HA-IgAや抗CTB-IgAの定量の際には、コーティング緩衝液に懸濁したHAワクチン(5 μ g/ml)やCTB(5 μ g/ml)50 μ lで、先ず96穴のEIAプレート(half-area, Costar, Cambridge, MA)各孔(well)をコートした。室温に2時間放置後、PBS-tweenでプレートを洗浄した、次に、1%牛血清アルブミン(BSA)(及び0.1%NaN₃)を含むPBS、100 μ lで各孔をコートした。4℃に一昼夜放置後、PBS-tweenで洗浄し、各孔に血清あるいは鼻汁試料を50 μ lづつ入れた。室温に2時間放置後、PBS-tweenで洗浄し、次に各孔に50 μ lづつ、PBS-tweenで希釈したアルカリホスファターゼ結合の山羊抗マウスIgA(α 鎖特異性、1:1000、米国、ザメイット ラボ社製)を加えた。室温に1時間放置後、PBS-tweenで洗浄後、各孔に100 μ l、pH9.8で1

0%ジエタノールアミンを含む緩衝液に懸濁したp-ニトロフェニルフェート(1mg/ml; シグマ社製)を加えた。室温で20~30分間放置後、発色をS J e i a オートリッド(モデル、ER-8000, 三光純薬社製)を使ってOD₄₁₀で測定した。検量線は、プレート毎に作り、各試料の値は、S J e i a オートリッドに内蔵されている二次のlogit-log方式によって回帰した検量線に基づいて決めた。抗HA-IgA定量の標準液としては、HAワクチンを鼻腔内より2週間毎に5回接種したマウスの鼻汁を8単位と決めて用いた。また、抗CTB-IgA定量の標準液としては、CTB(5 μ g)を鼻腔内より接種し4週目のマウスの鼻汁(IgA量の多かったもの)を8単位と決めて使用した。全IgA量の定量には、先ず1 μ g/mlの山羊抗マウスIgAを各孔に50 μ lづつ加える操作を除いて同様の操作を行った。全IgA定量の標準液としては、マウスの精製IgAミエローマ(米国、マイルス ラボラトリーズ社製)を用いた。

PR8株ウイルスによるマウスの感染:

マウスをアモバルビタルナトリウムで麻酔し、ウイルスの0.01%BSAを含む懸濁液をマウス左側鼻腔内に20 μ l滴下することにより、感染させた。PR8株ウイルスは、フェレットで148代、マウスで596代、孵化鶏卵で72継代した感染価10^{6.5}の漿尿液原液を、5,000~10,000倍希釈して用いた。この感染条件では非免疫マウスの90%以上が14日目以内に死亡するか、あるいは肺内にコンソリデーションを形成した。

肺のウイルス量の測定:

感染後3日目のウイルスから肺を摘出し、乳鉢磨砕し、PBSで10%乳剤とした。それを2500回転で遠心した上清を、10倍段階希釈後、それぞれの希釈液を孵化鶏卵(5個)に接種した。卵内でのウイルスの増殖は、漿尿液の赤血球凝集によって決定し、感染を示した卵に、接種した肺乳剤の最低希釈の価をEID₅₀により決定し、マウスの肺ウイルス価とした。肺ウイルス価は平均

値(\pm SD)表現した。実験によっては、1群5匹のマウス肺をブールして肺乳剤を作り、その肺ウイルス価を決定した。

罹患率:

1群5匹のマウスの10%肺乳剤中に、>10⁴のウイルスが検出されたマウスの数によって罹患率を示した。

統計処理:

生体内感染実験における感染防御能の有意差は、Student's testによって検定された。

以下、本発明の実施例について詳細に説明するが、本発明は何らこれのみに限定されるものではない。

(実施例)

実施例 1

インフルエンザHAワクチン-CTB製剤(点鼻剤の調製):

インフルエンザHAワクチン(1mg HA/ml)とリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したC

T Bと混合し、 $20\mu\text{g}$ 中のインフルエンザHAワクチン $1.5\sim 2\mu\text{g}$ と、CTB $3.5\sim 250\mu\text{g}$ を含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、インフルエンザHAワクチン-CTB点鼻剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。実験成績は、前述の通り。

実施例 2

インフルエンザHAワクチン-CTB製剤（注射剤）の調製：

インフルエンザHAワクチン（ $1\text{mg HA}/\text{m}\ell$ ）とリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBと混合し、 $0.5\text{m}\ell$ 中にインフルエンザHAワクチン $1.5\sim 2\mu\text{g}$ と、CTB $2.5\sim 250\mu\text{g}$ を含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、インフルエンザHAワクチン-CTB注射剤を調製した。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。実験成績は、前述の通り。

実施例 3

B型肝炎ワクチン-CTB製剤（注射剤）の調製：

B型肝炎ワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、 $20\mu\ell$ 中HBs抗原 $40\mu\text{g}$ 蛋白質と、CTBを $2.5\sim 250\mu\text{g}$ を含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、B型肝炎ワクチン-CTB注射剤を調製した。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したB型肝炎ワクチンおよびCTをマウスに接種し、3週間後の血中抗体産生を調べた。

この成績から、B型肝炎ワクチンのみを接種されたマウスでは、 $2^{5.6}$ 単位（受身赤血球凝集反応で）であったのに対し、CTを添加したものでは $10^{6.6}$ 単位であり、抗体産生が増強された。

B型肝炎ワクチンおよびCTを添加したときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価 P H A
C T	$2^{6.6}$
無添加	$2^{5.6}$

抗体価は受身赤血球凝集反応により測定した。

抗体価はマウス5頭の平均値。

実施例 4

百日せきワクチン-CTB製剤（点鼻剤）の調製：

百日せきワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、 $20\mu\ell$ 中に百日せきワクチン $14\mu\text{g}$ 蛋白質窒素と、CTBを $2.5\sim 250\mu\text{g}$ を含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、百日せきワクチン-CTB経鼻投与剤を調製した。

本品は 10°C 以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せきワクチン $13\mu\text{g}$ 蛋白質窒素 $20\mu\ell$ に、CTBおよびCTを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、抗PT抗体は、 4.1 国際単位以下であったのに対し、CTBを添加したものでは、 140.3 単位、CTを添加したものでは 232.5 単位と上昇した。抗FHA抗体では、ワクチンのみCTB添加、CT添加でそれぞれ 2.6 単位以下、 32.0 単位以下、 43.9 単位であり、CTBあるいはCTを添加したものは、ワクチンのみを接種した場合に比べ、著しく抗体産生が増強された。

百日せきワクチンにCTおよびCTBを添加し

たときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価	
	抗 P T	抗 F H A
C T	2 3 2 . 5	4 3 . 9
C T B	1 4 0 . 3	3 2 . 0
無添加	< 4 . 1	< 2 . 6

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はE L I S A 国際単位

実施例 5

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン-

CTB製剤(点鼻剤)の調製:

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し

、20μl中に混合ワクチン50μg蛋白質窒素とCTBを2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、百日せき-CTB経鼻投与剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンにCTBを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンのみを接種されたものでは、抗百日せきトキシン(P T)抗体は、2.0国際単位以下、抗ジフテリアトキソイド(D T)抗体は1.5単位以下、抗破傷風トキソイド(T T)は1.5単位であったのに対し、LTBを添加したものではそれぞれ150.0、110.5、120.0単位と、CTBを添加したものはワクチンのみのものに比べ、抗体産生が増強された。

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンに

CTBを添加したときの抗体産生の増強

抗原:接種量	C T B	抗体産生 E L I S A 価
百日せきワクチン 14μg	5μg	150.0
ジフテリアトキソ イド 16μg		110.5
破傷風トキソイド 15μg		120.0
百日せきワクチン 14μg	0μg	< 2.0
ジフテリアトキソ イド 16μg		< 1.5
破傷風トキソイド 15μg		< 1.5

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はE L I S A 国際単位

実施例 6

日本脳炎ワクチン-CTB製剤(注射剤)の調製:

日本脳炎ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中に日本脳炎10^{7.0}PFU相当量の不活化ウイルス粒子と、CTBを10.0~0μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、日本脳炎ワクチン-CTB注射製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した日本脳炎ワクチンおよびCTBあるいはCTを、1週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体量をみた。

その成績から、日本脳炎ワクチンのみを接種した場合に産生される中和抗体価は10^{1.0}であったのに対し、CTB添加、CT添加は、それぞれ10^{2.5}以上、10^{2.20}以上であり、CTB、CTを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

日本脳炎ワクチンにCTおよびCTB添加した
ときの抗体産生の増強

検 体	添 加 濃 度	中和抗体価 10 ⁿ
C T	0.05 μ g / MOUSE	3.39
	0.5 μ g	3.20
	5.0 μ g	3.52
C T B	0.05 μ g / MOUSE	2.58
	0.5 μ g	2.70
	5.0 μ g	3.39
無添加		1.88

麻しんワクチンにCTBを添加したときの抗体
産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	C T B	
麻しんワクチン 20 μ g	5 μ g	0.21
対 照 20 μ g	5 μ g	0.144

実施例 8

風しんワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製:

風しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20 μ l中にワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-CTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

抗体価はマウス10頭のプール血清の抗体価

実施例 7

麻しんワクチン-CTB製剤(点鼻剤)の調製:

麻しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20 μ l中に麻しんワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、麻しんワクチン-CTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から麻しんワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.144であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.209以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

上記のように調製した風しんワクチンおよびCTBを3週間で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみ投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.095であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.920以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

風しんワクチンにCTBを添加したときの抗体
産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	C T B	
風しんワクチン 20 μ g	5 μ g	0.920
対 照 20 μ g	0 μ g	0.095

おたふくかぜワクチン-CTB製剤（点鼻剤）の

調製：

おたふくかぜワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20 μ l中にワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-CTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.028であったのに対し、CTB添加ワクチンは、0.045以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

容器に適量分注して、麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-CTB点鼻剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は麻しん、風しん、おたふくかぜの各々は、0.14、0.09、0.15であったのに対し、CTB添加ワクチンは、各々0.29、0.30、0.24以上であり、CTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

おたふくかぜワクチンにCTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA価
抗 原	CTB	
おたふくかぜワクチン 20 μ g	5 μ g	0.05
対 照 20 μ g	0 μ g	0.028

実施例 10

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-CTB製剤（点鼻剤）の調製：

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20 μ l中に各々のワクチン7 μ g、1 μ g、7 μ g相当量のウイルス粒子と、CTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンにCTBを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA価
抗 原	CTB	
麻しんワクチン 7 μ g	5 μ g	麻しん 0.29
風しんワクチン 7 μ g		風しん 0.30
おたふくかぜワクチン 7 μ g		おたふく 0.24
対 照		麻しん 0.14 風しん 0.09 おたふく 0.15

実施例 11

ロタワクチン-CTB製剤（経口、点鼻剤）の調製：

ロタワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20 μ l中にワクチン3.3 μ g相当量のウイルス粒子とCTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ロタワクチン-CTB経口、点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したロタワクチンおよびCTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から、ワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、点鼻接種の場合、0.089であったのに対し、CTB添加ワクチンは0.281であり、また、経口接種の場合、0.018であったのに対し、CTB添加ワクチンは0.227であり、いずれもCTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を

増強した。

ロタワクチンにCTBを混合したときの抗体産生の増強

接 種 量					抗体産生 ELISA 価
抗 原				CTB	
ロ タ ワ ク チ ン	点 鼻 接 種	ワクチン	3.3 μ g	5 μ g	0.281
		対 照	3.3 μ g	0 μ g	0.089
	経 口 接 種	ワクチン	3.3 μ g	5 μ g	0.227
		対 照	3.3 μ g	0 μ g	0.018

実施例 12

マイコプラズマワクチン-CTB製剤（注射剤）の調製：

マイコプラズマワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、1ml中にワクチン 2.0×10^{10} CFU（コロニー形成単位）相当量のマイコプラズマと、CTBを10 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-CTB注射剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびCTBを2週間隔で3回ニワトリに投与し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。

その成績からマイコプラズマワクチンのみを投与した場合に比べ、CTB添加ワクチンは、ワクチンのみを接種した場合より著明に防御効果を示した。

マイコプラズマワクチンにCTBを添加したときの攻撃に対する病変の減少

接 種 量		病 変
抗 原	CTB	
全 菌 体 *** 1.0×10^{10} CFU	5 μ g	* ** 3/10 125
超音波処理 1.0×10^{10} CFU	5 μ g	3/11 129
対 照 1.0×10^{10} CFU	0 μ g	10/10 277

* : 分母は被検動物数、分子は病変を認めたもの

** : 検各群の病変の平均値

*** : コロニー形成単位

実施例 13

百日せきワクチン-LTB製剤(点鼻剤)の

調製:

百日せきワクチンとリン酸緩衝液食塩水に溶解し無菌濾過したCTBとを混合し、20μℓ中に百日せきワクチン14μgと蛋白質窒素と、LTBを2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、百日せきワクチン-LTB経鼻投与剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せきワクチン13μg蛋白質窒素20μℓに、LTBおよびCTを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、抗PT抗体は、4.2国際単位以下であったのに対し、LTBを添加したものでは、150.3単位、LTを添加したものでは230.5単位と上昇した。抗FHA抗体では、ワクチンのみ、LTB添加、LT添加でそれぞれ2.3単位以下

、30.0単位以下、40.5単位であり、LTBあるいはLTを添加したものは、ワクチンのみを接種した場合に比べ、著しく抗体産生が増強された。

百日せきワクチンにLTおよびLTBを添加したときの抗体産生の増強

検 体	抗 体 価	
	抗 P T	抗 F H A
L T	2 3 0 . 5	4 0 . 5
L T B	1 5 0 . 3	3 0 . 0
無添加	< 4 . 2	< 2 . 3

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はE L I S A 国際単位

実施例 14

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチン-

LTB製剤(点鼻剤)の調製:

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、20μℓ中に混合ワクチン50μg蛋白質窒素とLTBを2.5~250μgを含むように調製し、適当な防腐剤および安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、百日せき-LTB経鼻投与剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンにLTBを添加し、マウスの鼻腔内に接種し、さらに4週後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。

この成績から、百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンのみを接種されたものでは、抗百日せきトキシン(PT)抗体は、1.8国際単位以下、抗ジフテリアトキソイド(DT)抗体は、1.4単位以下、抗破傷風トキソイド(TT)は1.2単位であったのに対し、LTBを添加したものではそれぞ

れ、140.0、80.5、100.5単位と、LTBを添加したものはワクチンのみのものに比べ、抗体産生が増強された。

百日せき・ジフテリア・破傷風混合ワクチンにLTBを添加したときの抗体産生の増強

抗原：接種量	L T B	抗体産生 E L I S A 価
百日せきワクチン 14 μ g	5 μ g	140.0
ジフテリアトキソ イド 16 μ g		80.5
破傷風トキソイド 15 μ g		100.2
百日せきワクチン 14 μ g	0 μ g	< 1.8
ジフテリアトキソ イド 16 μ g		< 1.4
破傷風トキソイド 15 μ g		< 1.2

抗体価はマウス5頭の平均値

抗体価はE L I S A 国際単位

風しんワクチンにL T Bを添加したときの抗体 産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	L T B	
風しんワクチン 3 μ g	5 μ g	0.854
対 照 3 μ g	0 μ g	0.133

実施例 16

麻しんワクチン-L T B製剤（点鼻剤）の調製：

麻しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL T Bとを混合し、20 μ l中に麻しんワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、L T Bを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、麻しんワクチン-L T B点鼻剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に

実施例 15

風しんワクチン-L T B製剤（点鼻剤）の調製：

風しんワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したL T Bとを混合し、20 μ l中にワクチン3 μ g相当量のウイルス粒子と、L T Bを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-L T B点鼻剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した風しんワクチンおよびL T Bを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるE L I S A抗体価は0.133であったのに対し、L T B添加ワクチンは、0.854以上であり、L T Bを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびL T Bを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から麻しんワクチンのみを投与した場合に産生されるE L I S A抗体価は、0.182であったのに対し、L T B添加ワクチンは、0.332以上であり、L T Bを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

麻しんワクチンにL T Bを添加したときの抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 E L I S A 価
抗 原	L T B	
麻しんワクチン20 μ g	5 μ g	0.332
対 照 20 μ g	0 μ g	0.182

おたふくかぜワクチン-LTB製剤（点鼻剤）の

調製：

おたふくかぜワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、20 μ l中にワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、LTBを5 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注し、ワクチン-LTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は0.023であったのに対し、LTB添加ワクチンは、0.074以上であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

器に適量分注して、ワクチン-LTB点鼻製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績からワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、麻しん、風しん、おたふくかぜの各々は、0.18、0.07、0.13であったのに対し、LTB添加ワクチンは、各々0.34、0.27、0.28以上であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンにLTBを添加したときの抗体産生の増強

抗体産生の増強

接 種 量		抗体産生 ELISA価
抗 原	LTB	
おたふくかぜ ワクチン 20 μ g	5 μ g	0.074
対 照 20 μ g	0 μ g	0.023

実施例 18

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチン-LTB製剤（点鼻剤）の調製：

麻しん・風しん・おたふくかぜ混合ワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、20 μ l中に各々のワクチン7 μ g、1 μ g、7 μ g相当量のウイルス粒子と、LTBを5 μ g含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容

接 種 量		抗体産生 ELISA価
抗 原	LTB	
麻しんワクチン 7 μ g	5 μ g	麻しん 0.34
風しんワクチン 1 μ g		風しん 0.27
おたふくかぜ ワクチン7 μ g		おたふく 0.28
対 照	0 μ g	麻しん 0.18
		風しん 0.07
		おたふく 0.13

実施例 19

ロタワクチン-LTB製剤（経口、点鼻剤）の調製：

ロタワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBと混合し、20 μ l中にワクチン3.3 μ g相当量のウイルス粒子とLTBを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-LTB経口、点鼻製剤を調製した。本品は、10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびLTBを3週間隔で2回マウスに投与し、血中の抗体産生をみた。

その成績から、ワクチンのみを投与した場合に産生されるELISA抗体価は、点鼻接種の場合0.063であったのに対し、LTB添加ワクチンは、0.348以上であり、経口接種の場合は0.024であったのに対し、LTB添加ワクチンは0.177であり、LTBを添加した場合は、ワクチンのみを接種した場合より著しく抗体産生を増強した。

ロタワクチンにLTBを混合したときの抗体産生の増強

接 種 量					抗体産生 ELISA 価
抗 原				LTB	
ロ タ ワ ク チ ン	点 鼻 接 種	ワクチン	3.3 μ g	5 μ g	0.348
		対照	3.3 μ g	0 μ g	0.063
	経 口 接 種	ワクチン	3.3 μ g	5 μ g	0.177
		対照	3.3 μ g	0 μ g	0.024

実施例 20

マイコプラズマワクチン-LTB製剤（注射剤）の調製：

マイコプラズマワクチンとリン酸緩衝食塩水に溶解し無菌濾過したLTBとを混合し、1ml中にワクチン 2.0×10^{10} CFU（コロニー形成単位）相当量のマイコプラズマと、LTBを10 μ gを含むように調製し、適当な安定剤を加え、適当な容器に適量分注して、ワクチン-LTB注射製剤を調製した。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したワクチンおよびLTBを2週間隔で3回ニワトリに投与し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。

その成績からマイコプラズマワクチンのみを投与した場合に比べ、LTB添加ワクチンは、ワクチンのみを接種した場合より著しく防御効果を示した。

マイコプラズマワクチンにLTBを添加したときの攻撃に対する病変の減少

接 種 量		病 変	
抗 原	LTB		
全菌体 *** 1.0×10^{10} CFU	5 μ g	* ** 3/12	1.23
超音波処理 1.0×10^{10} CFU	5 μ g	2/11	1.27
対照 1.0×10^{10} CFU	0 μ g	10/10	2.77

* : 分母は被検動物数、分子は病変を認めたもの

** : 被検各群の病変の平均値

*** : コロニー形成単位

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明のワクチン製剤投与後の一次抗体
産生応答の経過を示し、

第2図は本発明のワクチン製剤投与による肺内ウ
イルス感染数の変動を示す。

手続補正書

平成1年12月15日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成1年 特許願 第6759号

2. 発明の名称

ワクチン製剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都港区白金5丁目9番1号

名称 北里研究所(社団法人)

代表者 水之江 公英

(ほか1名)

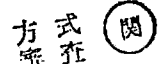
4. 代理人 〒170

東京都豊島区北大塚2-25-1

太陽生命大塚ビル3階 電話(917)1917

(7528) 弁理士 小林 和憲

(ほか1名)



5. 補正命令の日付

平成1年11月20日

平成1年12月 5日(発送日)

6. 補正の対象

平成1年3月3日付提出の手続補正書の補正の
対象の欄

7. 補正の内容

別紙のとおり

手続補正書

平成1年 3月 3日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成1年 特許願 第6759号

2. 発明の名称

ワクチン製剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都港区白金5丁目9番1号

名称 北里研究所(社団法人)

代表者 水之江 公英

4. 代理人 〒170

東京都豊島区北大塚2-25-1

太陽生命大塚ビル3階 電話(917)1917

(7528) 弁理士 小林 和憲

(ほか1名)



5. 補正命令の日付
自発
6. 補正の対象
明細書の全文